Aus der Medizinischen Universitätsklinik
und Poliklinik Würzburg

Direktor: Prof. Dr. H. A. Kühn

Untersuchung zur Frage einer Beteiligung von Alpha-1-Fetoprotein an der Pathogenese von chronisch aggressiven Hepatitiden.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Karl Götz

aus Arzberg

Würzburg, den 7. Januar 1980

Aus der Medizinischen Universitätsklinik
und Poliklinik Würzburg

Direktor: Prof. Dr. H. A. Kühn

Untersuchung zur Frage einer Beteiligung von Alpha-1-Fetoprotein an der Pathogenese von chronisch aggressiven Hepatitiden.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Karl Götz

aus Arzberg

Würzburg, den 7. Januar 1980

Referent: Priv. Doz. Dr. I. O. Auer

Korreferent: Prof. Dr. H. A. Kühn

Dekan: Prof. Dr. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 23. 6. 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Würzburg

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

A) THEMATISCHER RAHMEN - PROBLEMSTELLUNG

1. Einleitung

2. Allgemeine Problemstellung

3. Spezielle Problemstellung

B) EXPERIMENTELLER TEIL

1. Krankengut

2. Methodik

3. Ergebnisse

C) DISKUSSION

A 1 EINLEITUNG

1. Alpha-1-Fetoprotein (AFP) gehört in die Klasse der onkofeotalen Antigene. Dies sind Substanzen, die während der Embryonalzeit gebildet werden, post partum aber im Wesentlichen nur mehr in bestimmten malignen Tumoren in erhöhter Konzentration neu produziert werden. So ist AFP ein Hauptprotein des Serums vom frühen embryonalen Leben bis zum 1. Lebensmonat, wo Albumin und Transferrin in relativ kleinen Mengen vorhanden sind (Ruoslahti et al., 1974). Beim Menschen wird es zuerst im Dottersack und in der Leber (erster bis zweiter Embryonalmonat) und anschließend überwiegend in der Leber produziert (Gitlin, 1975).

   AFP ist ein dem Albumin ähnliches saures Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von zirka 70 000. Durch Gelelektrophorese fanden sich mindestens drei Arten von menschlichem AFP (HAFP) (Alpert et al., 1975). Der Ursprung dieser unterschiedlichen Formen, d. h. ob sie a priori oder erst postsynthetisch entstehen, ist unbekannt.

   Eine interessante Studie zeigt, daß AFP und Albumin eine signifikante Übereinstimmung in den Aminosäuren aufweisen, was wiederum die Möglichkeit nahelegt, daß AFP ein embryonales Analog des Albumins sein könnte, ähnlich dem fetal-adulten Hämoglobinsystem (Ruoslahti et al., 1976)

   AFP wird in Zellzyklus überwiegend während der Phasen G_1 und S synthetisiert. Der AFP-Spiegel

wird durch Hormone wie Glucocorticoide, Thyroxin und Adrenalin beeinflußt, sie alle bewirken einen dramatischen Abfall des Blutspiegels bei neugeborenen Mäusen (Belanger et al., 1975). Es wird diskutiert, daß AFP von "Intermediärzellen" produziert wird, die ontogenetisch zwischen Stammzelle und reifer Leberzelle liegen. Glucocorticoide sollen die Proliferation der AFP-produzierenden Zellen blockieren.

Eine Schlüsselstellung nimmt auch die Frage ein, in wieweit die AFP-Synthese und der Zellzyklus gekoppelt sind. Es erscheint durchaus möglich, daß während des Zellzyklus gebildetes AFP in irgendeiner Weise das Zellwachstum kontrolliert, obwohl exogen zugeführtes AFP die Zellwachstumsrate von fetalen Hepatozyten nicht beeinflußt (Leffert et al., 1974).

Jede Spezies besitzt ein charakteristisches Muster der Konzentrationsänderungen von AFP während ihrer Embryonalentwicklung. Beim Menschen erreicht HAFP ein Maximum im fetalen Serum um den 3. Gestationsmonat (3,0 mg/ml) und fällt dann nahezu linear bis zur Geburt (Gitlin et al., 1966). Obwohl die Konzentration von HAFP im fetalen Serum nach dem ersten Trimester abnimmt, steigt die Gesamtmenge des synthetisierten HAFP bis 20 Wochen und bleibt dann bis zur 32. Woche konstant. Demzufolge ist die Abnahme der Serumkonzentration nicht durch verminderte Synthese bedingt, sondern eher durch die Tatsache, daß das Gewicht des Foeten und so das Volumen, in dem HAFP sich verteilt, noch schneller als die Synthese ansteigen (Gitlin et al., 1966). Nach der Geburt fällt der HAFP-Spiegel

sehr rasch (biologische Halbwertszeit des HAFP beträgt 3,5 bis 4 Tage) während der ersten und zweiten Lebenswoche, dann langsamer, bis er mit dem 1. bis 2. Lebensjahr den normalen Erwachsenenspiegel erreicht (Masseyeff et al., 1975).

Erhöhte Serumspiegel von HAFP (über 500 ng/ml) wurden u. a. bei gesunden Schwangeren beobachtet mit einem Maximum im ersten Trimenon der Schwangerschaft (Gitlin et al., 1967). Der Grund für den im Vergleich mit den Spitzenkonzentrationen beim Foeten späten Anstieg bei Schwangeren in der 12. bis 14. Woche ist unbekannt.

Seit der Entwicklung von Radioimmunassays für HAFP ist bekannt, daß HAFP auch im Serum gesunder Erwachsener in Beträgen, die etwa einen Betrag von 1/10 000 der maximalen fetalen Konzentration ausmachen, vorhanden ist. Beim Menschen liegen die Normalwerte im Serum bei 1 bis 25 ng/ml. Die Unterschiede in der HAFP-Synthese beim Embryo, beim gesunden Erwachsenen und beim Patienten mit HAFP-produzierenden Tumoren sind also quantitativer und nicht qualitativer Natur (Weiss, 1978).

2. Mögliche biologische Funktionen des HAFP sind bisher nicht sicher bekannt. So wurde eine Carrierfunktion für Östrogene von Ratten- und Mäuse-AFP beschrieben (Uriel et al., 1972). Menschliches AFP dagegen scheint - wenn überhaupt - Steroide nur in äußerst geringem Umfang (Savu et al., 1974; Swarz et al., 1974; Uriel et al., 1974) zu binden, d. h. 150 mal weniger als Ratten-AFP (Uriel et al., 1975).

Des weiteren wurde 1971 zuerst von KASAKURA (Kasakura 1971) spekulativ die Möglichkeit einer immunsuppressiven Wirkung des Alpha-1-Fetoprotein diskutiert. Kasakura hatte beobachtet, daß Lymphozyten nach Inkubation in Nabelschnurblut eine eingeschränkte Fähigkeit auf mitogene Stimuli zu reagieren zeigten.
TOMASI und Mitarbeitern gelang es erstmalig, für Mäuse-AFP einen breiten immunsuppressiven Effekt auf eine vielfältige Anzahl immunregulativer Funktionen nachzuweisen (Murgita und Tomasi, 1975 a + b). Diese Arbeiten zeigten, daß Mäuse-AFP die primäre und sekundäre Antikörperproduktion, die proliferative Reaktion der Lymphozyten auf sowohl mitogene Stimuli als auch auf T- bzw. B-lymphozytenabhängige Antigene inhibiert. Dasselbe geschah hinsichtlich der primären zellvermittelten Zytotoxizität (siehe oben).

Obwohl es einigen Autoren nicht gelang, eine inhibitorische Aktivität auch für menschliches AFP nachzuweisen, zeigten 1976 AUER und KRESS und unabhängig davon YACHNIN eine immunsuppressive Wirkung von Alpha-1-Fetoprotein auf einzelne T-zellvermittelte Immunantworten. So wird vor

allem die primäre zellvermittelte Immunantwort, getestet in der gemischten Lymphozytenkultur (Auer et al., 1976; Auer et al., 1977; Auer, 1977) sowie die Stimulation durch bestimmte T-Zellmitogene gehemmt (Yachnin, 1976; Yachnin et al., 1976). Diese immunsuppressive Funktion erfolgt möglicherweise über die Aktivierung von T-Suppressorzellen durch HAFP (Alpert et al., 1978).

Eine immunbiologische in vivo Rolle des HAFP ist nach wie vor unklar. Die bisher gemachten Erfahrungen hinsichtlich des in vitro Einflusses von HAFP auf Immunreaktionen, wie Stimulierung der Lymphozyten durch Mitogene oder Antigene sind vorläufig ohne praktische Konsequenzen für den Kliniker.

3. Bedeutung des HAFP in der Klinik heute

Im Rahmen der serologischen Tumordiagnostik wurden der Krebsbekämpfung durch die Entdeckung tumorassoziierter Antigene sowie deren Nachweisbarkeit im Serum neue Impulse gegeben. Diese tumorassoziierten Antigene sind häufig bereits vor dem Auftreten klinischer Symptome nachweisbar. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um Glykoproteine, die während der fetalen Entwicklungsperiode von den Organen des Embryo gebildet werden. Nach der Geburt wird nur mehr eine Minimalsynthese dieser Antigene aufrechterhalten. Entsteht nun beim Erwachsenen ein maligner Tumor in einem Organ, das während der fetalen Entwicklung ein derartiges Antigen synthetisierte, dann geht dies

häufig mit der Wiederaufnahme einer gesteigerten Produktion des onkofetalen Antigens durch die Tumorzellen einher. In der serologischen Tumordiagnostik macht man sich nun die Ausschwemmung dieser Antigene ins Serum zunutze, indem man den Serumspiegel dieser onkofetalen Antigene bestimmt (Zusammenfassung in Weiss, 1978).

Die HAFP-Bestimmung im Serum ist eine der wenigen serologischen Untersuchungsmethoden, die aufgrund ihrer beachtlichen "Organspezifität" als Screeningmethode für primäre Leberzellkarzinome (PLK) und Keimzelltumoren (sofern diese vitelline Strukturen enthalten) diskutiert werden. Weitere Indikationen sind die pränatale Erfassung von fetalen Mißbildungen sowie die postoperative Überwachung von Patienten mit HAFP-produzierenden Tumoren, respektive die Rezidiv-Früherkennung.

A 2 ALLGEMEINE PROBLEMSTELLUNG

Die immunologischen in vitro Funktionen von Alpha-1-Fetoprotein waren und sind Anlaß für eine intensive Suche nach einer möglichen immunbiologischen in vivo Rolle des AFP.

So wird die Möglichkeit diskutiert, HAFP könnte Bedeutung haben für den Schutz des histoinkompatiblen Foeten vor der Abstoßung durch das mütterliche Immunsystem. Spezifische und unspezifische immuninhibitorische Aktivitäten wurden im Serum von Schwangeren wie Foeten (Ayoub et al., 1971; Kasakura, 1971; Smith et al., 1972; Thong

et al., 1973) nachgewiesen.

PANVERS und Mitarbeiter haben gezeigt, daß bei Probanden mit hohem Risiko für die Entwicklung eines primär malignen Hepatoms die Häufigkeit transitorischer Anstiege der Serum-HAFP-Konzentration höher war als bei anderen Probanden. Dieses Serum-HAFP mag lediglich Überfluß-HAFP repräsentieren, das im speziellen Mikroenvironment des Krankheitsprozesses, den proliferativen Tumorzellen, wesentlich höhere Konzentrationen erreichen mag. So könnte die Blockierung des immunologischen Überwachungsmechanismus, der normalerweise zu einer Kontrolle maligne transformierter Zellen führt ("immune surveillance"), das Tumorzellwachstum ermöglichen.

A 3 SPEZIELLE PROBLEMATIK DER DOKTORARBEIT

Es ist bekannt, daß auch bei der akuten viralen Hepatitis temporäre Anstiege von HAFP gefunden werden (Eleftheriou et al., 1977; Massoux et al., 1977). Es bestehen reichlich Hinweise, daß die virale Hepatitis nicht Folge eines zytopathogenetischen Effektes des Virus ist, sondern eher Folge einer zytotoxischen Aktivität der T-Zellen, die gegen den Virus sensibilisiert sind. Der Angriff dieser T-Zellen, ursprünglich mit der Absicht, den Virus zu eliminieren, hat die Zerstörung der virusinfizierten Hepatozyten zur Folge, was zu dem klinischen Bild der akuten viralen Hepatitis führt. Unter den Bedingungen einer eingeschränkten T-Zellreaktivität mag so

entweder ein "Carrier"-Status oder wegen der inkompletten Elimination des Virus, die jedoch kontinuierlich anhält, eine chronische Erkrankung resultieren. So wurde spekuliert (Auer, 1979), daß eine unterschiedliche HAFP-Synthese bei der Virushepatitis die T-Zellreaktion modifizieren könne und somit dann zu einer chronischen Erkrankung prädisponieren könne, wenn lokal in der Leber hohe immunsuppressive Konzentrationen von HAFP produziert werden.

So wurde denn auch berichtet, daß in vivo gebundenes HAFP an der Oberfläche von Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL) gefunden wurde, und zwar nur bei solchen Patienten mit chronisch aggressiver Hepatitis (CAH), die sowohl eine verminderte T-Zellzahl als auch eine eingeschränkte T-Zellimmunreaktivität zeigten. Die Suppression der Immunreaktionen ging verloren nach Inkubation der Lymphozyten bei 37 Grad Celsius für mehrere Tage, was angeblich zu einem Ablösen des in vivo gebundenen HAFP von der Lymphozytenoberfläche führte. Die Überstände dieser Kurzzeit-Lymphozytenkulturen erlangten dadurch suppressive Aktivität parallel mit dem Erscheinen des sich ablösenden HAFP (Tomasi et al., 1975; Keller et al., 1976).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Hypothese, daß die immunsuppressive Aktivität von HAFP eine pathogenetische Rolle bei der Prädisposition eine CAH zu entwickeln, spiele, als weitgehend belegt angesehen.

Wegen dieser Berichte untersuchten wir die

mögliche immunregulatorische Rolle von HAFP im Rahmen der diskutierten pathogenetischen Möglichkeiten bei CAH.

B EXPERIMENTELLER TEIL

1. Krankengut und Kontrollen

Wir untersuchten ein Kollektiv von 18 Personen mit histologisch verifizierter CAH. Den gesunden, in Alter und Geschlecht den Patienten angepaßten Kontrollpersonen wurde zur gleichen Tageszeit wie den Kranken Blut abgenommen, um dem zirkadianen Rhythmus der Reaktivität verschiedener T-Zellfunktionen gerecht zu werden (Tavadia et al.,1975; Kaplan et al., 1976)

2. Methodik

2.1. Isolierung der Lymphozyten

Die Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL) wurden mittels eines Ficoll-Gradienten isoliert wie in Auer et al., 1978 b beschrieben. Die Methode war wie folgt:
Heparinisiertes Vollblut (1:2 mit phosphatgepufferter Salzlösung, PBS, verdünnt) wurde über einen Ficoll-Natrium-Metrizoat-Gradienten

geschichtet, Dichte 1,o77 g/l, und mit 400 g an der Zwischenphase 30 Minuten lang bei 20 Grad Celsius nach Boyum (Boyum, 1968) zentrifugiert. Die Zellen wurden dann 3 x in PBS bei 20 Grad Celsius gewaschen und, nach Entfernung der Blutplättchen bei 200 g, schließlich in RPMI 1640 plus HEPES (25 mM) resuspendiert. Die gewonnene Menge an Lymphozyten schwankte zwischen 55 und 75 %. Die Zellviability (Anfärbung der abgestorbenen Zellen mit Trypanblau) ergab in allen Fällen eine Quote von über 97 %.

2.2. Nachweis von in vivo gebundenem HAFP mit Hilfe der direkten Immunfluoreszenz

Unmittelbar nach der Isolierung wurden PBL bei 4 Grad Celsius mit Fluoresceinisothiocyanat(FITC)-konjugiertem Ziegen-Antihuman-HAFP-Antiserum beladen. Dabei folgten wir der von Auer et al., 1978 b im Detail beschriebenen Methode. Monozyten wurden mit Hilfe der Latexpartikel-Phagozytose gekennzeichnet. Der Vorgang in Kürze:
0,1 ml eines Ziegen-Anti-HAFP-Serums, konjugiert mit FITC, wurden mit 0,1 ml Lymphozytensuspension (20 - 30 x 10^6/ml) in RPMI 1640 mit HEPES (25 mM), NaN_3 (10 mM) und hitzeinaktiviertem foetalen Kälberserum (FCS, 10 %ig) inkubiert. Das Konjugat wurde vor der Lagerung bei 150 000 g 60 Minuten lang ultrazentrifugiert und vor Wiederverwendung einer Zentrifugation bei 20 000 g unterworfen. Das FITC-Antiserum wurde mit PBS (pH 7,8) gepuffert und mit FCS versetzt. Es wurde sowohl in der zweifachen Konzentration verwendet, bei der sich ein gleichbleibender Zellwert ergibt, d. h. bei

einer Verdünnung von 1:2, als auch in einer Verdünnung von 1:4 und 1:8. Nach Inkubation für 30 Minuten bei 4 Grad Celsius wurden die Zellen 3 x bei 4 Grad Celsius gewaschen. Die Zellen wurden dann suspendiert. 200 Zellen wurden unter Verwendung eines Leitz Orthoplan Mikroskops (HBO 200 Super Pressure Mercury Lampe, KP 490 Interferenzfilter, K 525 Barrierfilter) ausgewertet.

2.3. Kurzzeitlymphozytenkulturen

Alle Kurzzeitlymphozytenkulturen wurden in Plastiklochplatten (Greiner, Nürtingen) mit Rundboden nach der Mikrokulturtechnik durchgeführt.

2.3.1. Lymphozyten
Mitogenstimulierte Lymphozytenkulturen

Zur Stimulierung von PBL durch Phytohämagglutinin (PHA), Concanavalin A (Con A), Pokweed Mitogen (PWM) sowie Purified Protein Derivate (PPD) wurden 0,1 ml Antigen- bzw. Mitogenlösung in serumfreiem Kulturmedium oder 0,1 ml serumfreies Kulturmedium alleine (als unstimulierte Kontrolle) zu jeweils 1 x 10^5 Zellen in 0,1 ml Kulturmedium (RPMI 1640 plus HEPES (25 mM) mit Penicillin (50 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml) und L-Glutamin (2 mM) pro Loch sowie 10 % hitzeinaktiviertem AB-Pool) gegeben. Die Kulturen wurden alle im Duplikat oder Triplikat durchgeführt. Falls Überstände (0,1 ml, siehe unten) zu den Kulturen gegeben wurden, waren die 1 x 10^5 PBL in 0,05 ml enthalten. Dosis-Antwort-Kurven mit suboptimalen und optimalen Dosen wurden für PHA, Con A, PWM und

PPD angefertigt. Die Immunreaktion auf PHA und Con A wurde zusätzlich in Zeitverlaufsstudien untersucht.

Dosen:
PHA (PHA purified, Wellcome Reagents, England): 0,2, 1,0 und 10 ug/ml Endkonzentration;
Con A (Con A, 3 x kristallisiert, Miles-Yeda, Israel): 5, 25 und 50 ug/ml;
PWM (GIBCO, Grand Island, USA): 0,4, 15 und 85 ug/ml;
PPD (Statens Serum Institute, Denmark): 1, 100 und 500 ug/ml.

Inkubationszeiträume:
PHA und Con A: 84, 108 und 132 Stunden;
PWM, PPD und MLC: 132 Stunden (jeweils in feuchtigkeitsgesättigter 5 % CO_2 - 95 % Luft-athmosphäre).
Danach wurden 0,4 uCi mit ^3H markiertes Methyl-Thymidin (^3H-TdR) in einem Volumen von 0,020 ml in jedes Loch der durch Mitogene stimulierten Kulturen für die letzten vier Stunden und bei den durch PPD stimulierten Kulturen und den MLC's für die letzten acht Stunden der Inkubation gegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe eines halbauto-matischen Multiple-Proben-Sammlers (MASH II, Microbiological Associates, Bethesda, Maryland, USA) geerntet und das in die DNA inkorporierte ^3H-TdR wurde mit Hilfe eines Packard TriCarb Liquid Scintillationszählers nach Thurman (Thurman et al., 1973) ermittelt. Die Ergebnisse sind in " % der counts per minute (cpm) der Kontrollen " angegeben. Die Zahlen errechnen sich nach folgender Formel:

Antwort in % der cpm der Kontrollen =

$$\frac{\text{cpm der Patienten x 100}}{\text{cpm der Kontrollen}}$$

Ein Beispiel dafür wird in Tabelle 1a und 1b gezeigt.

Tab. 1a:

		cpm			
		Con A (ug/ml)			PHA
Proband	IZ (h)	5	25	50	
I (CAH)	84	3579	7987	9393	
	108	5529	7154	7797	
	132	3826	4945	7451	
II (N)	84	3843	7932	10897	
	108	5967	8598	12150	
	132	6264	7214	8580	

Tabelle 1a: Antwort des Patienten I mit chronisch aggressiver Hepatitis (CAH) und der Kontrollperson II (N). Die Zahlen geben die "counts per minute" (cpm) an.
Mitogendosis Con A: 5, 25 und 50 ug/ml.
IZ (h): Inkubationszeiträume in Stunden.

Tab. 1b:

		% der cpm der Kontrollen			
Proband	IZ(h)	Con A		PHA	
		SO	O	SO	O
	84	93	86		
I	108	92	64		
	132	61	87		

Tabelle 1b: Antwort des Patienten I in % der "counts per minute" (cpm) der alters- und geschlechtsangepaßten Kontrollperson.
SO: suboptimale Mitogendosis
O: optimale Mitogendosis
IZ: Inkubationszeitraum in Stunden (h)

Einweggemischte Lymphozytenkulturen (MLC) wurden nach Thurman (Thurman et al., 1973) durchgeführt:
In jedes Loch der Rundbodenplatten wurden 1 x 10^5 Responderzellen und 1 x 10^5 Stimulatorzellen (bestrahlt mit 4500 rad) in 0,1 ml sowie 0,1 ml Kulturmedium gegeben. Kontrollkulturen enthielten 1 x 10^5 PBL (Antwort- oder Stimulatorzellen allein) mit 0,1 ml Kulturmedium. Wenn Überstände (0,1 ml, siehe unten) zugegeben wurden, fügten wir nur 0,05 ml Kulturmedium hinzu. Das weitere Vorgehen war wie oben beschrieben.

2.3.2. Überstände

Um Überstände von unstimulierten Kurzzeit-lymphozytenkulturen zu erhalten, wurden 2×10^5 PBL in 0,2 ml/Loch über 6 Tage bei 37 Grad Celsius in einer 5 % CO_2 - 95 % Luft - Athmosphäre inkubiert. Die Zellsuspensionen wurden gesammelt und nach Abzentrifugieren der Zellen wurde der so gewonnene Überstand 15 Minuten bei 15 000 RPM in einer Sorwall-Ultrazentrifuge von noch etwa vorhandenen Zellbestandteilen befreit. Überstände der sechstägigen Kulturen wurden in einem Volumen von 0,1 ml pro Loch zu 0,05 ml Kulturmedium mit 1×10^5 frisch gewonnenen PBL von Normalpersonen gegeben. Bei diesen Zellen wurden dann im Test die verschiedenen "cell mediated immunity" (CMI)-Parameter im Vergleich zu Kulturen, denen lediglich 0,1 ml Kulturmedium zugesetzt worden war, gemessen.

3. Ergebnisse

Der gesamte Arbeitsgang ist schematisch in Abbildung 1 aufgezeichnet.

A in Abb. 1: Wir untersuchten am Tag 0 (Tag der Blutentnahme) 18 Patienten mit CAH sowie alters- und geschlechts-angepaßte Kontrollen (N) auf in vivo gebundenes HAFP an PBL mit Hilfe der direkten Immunfluoreszenz (IF).

B in Abb. 1: Es wurde die Reaktivität der PBL von CAH - Patienten im Vergleich mit Gesunden (N) hinsichtlich bestimmter

Abb. 1:

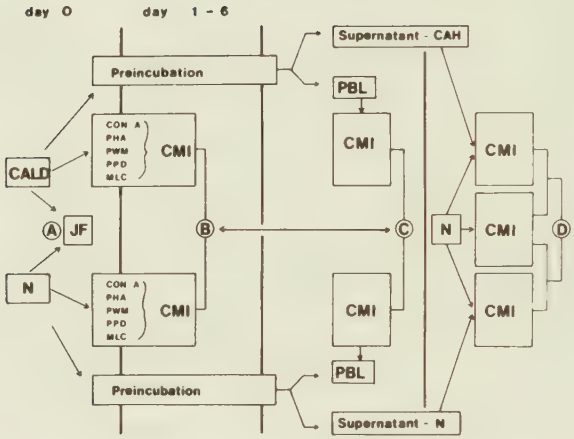

Abbildung 1: Überblick über den gesamten Arbeitsgang (schematisiert).

CALD: Kollektiv der Patienten mit chronisch aggressiver Hepatitis
N : Kollektiv der Kontrollpersonen
CMI : "cell mediated immunity"
IF : Immunfluoreszenz
PBL : Periphere Blutlymphozyten

in vitro Parameter der zellvermittelten Immunität (CMI) untersucht. Dazu wurden die PBL mit allogenen PBL stimuliert sowie mit den Mitogenen PHA, Con A, PWM und dem löslichen Recall-Antigen PPD. Diese Befunde wurden in Beziehung gesetzt zu dem Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von in vivo gebundenem HAFP.

C in Abb. 1: Es wurden des Weiteren die PBL auch nach Präinkubation über 6 Tage bei 37 Grad Celsius in den gleichen Funktionstesten der CMI untersucht. Diese Ergebnisse wurden in Bezug gesetzt zu den Untersuchungen vor der Präinkubation (B versus C) sowie

D in Abb. 1: dem Verhalten der so gewonnenen Kulturüberstände in ihrer Wirkung auf die PBL Gesunder.

3.1. Untersuchung der Frage von in vivo an PBL gebundenem HAFP (A in Abbildung 1)

Wir untersuchten PBL mittels der direkten Immunfloureszenztechnik auf in vivo gebundenes HAFP. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Bei Patienten mit CAH und bei Kontrollpersonen wurde ohne signifikante Unterschiede eine unwesentliche, vergleichbare Anzahl kleiner Lymphozyten markiert, während ungefähr ein Drittel bis die Hälfte der Makrophagen "positiv" waren. Dabei fiel auf, daß ein - statistisch jedoch nicht signifikanter - größerer Anteil an Makrophagen bei CAH-Patienten markiert wurde.

Tab. 2:

Verdünnung des Antiserums	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 2	1 : 4	1 : 8
C A H						
$\bar{x} \pm 1$ SD	0,5±0,9	0,3±0,4	0,1±0,3	49±17	52±21	53±17
Bereich	0 - 2,6	0 - 1,2	0 - 0,8	30 - 77	25 - 74	27 - 74
Kontrollen						
$\bar{x} \pm 1$ SD	0,3±0,6	0,3±0,5	0	35±24	35±24	26±30
Bereich	0 - 1,6	0 - 1,6	0	0 - 57	0 - 50	0 - 58

Tabelle 2: Markierbarkeit der PBL und der Makrophagen von CAH-Patienten und Gesunden mit Anti-HAFP-Antiserum in der direkten Immunfloureszenz.
Zahlenangaben in Prozent.

3.2. Testung der Lymphozytenreaktivität frisch gewonnener PBL (B in Abbildung 1)

Vier CAH-Patienten zeigten eine deutliche Einschränkung verschiedener in vitro Parameter der CMI (siehe Tabelle 3), d. h. sie erbrachten eine niedrigere Antwort als 50 % der gleichzeitig getesteten geschlechts- und altersangepaßten Kontrollen.

So lag bei einem CAH-Patienten (R.) eine mehr allgemeine Einschränkung der Reaktionsfähigkeit der PBL vor, am deutlichsten im suboptimalen PHA-, dem optimalen Con A- und dem höheren PWM-Dosisbereich.

Ein anderer Patient (H.) zeigte eine ausgeprägte selektive Reduktion der Mitogen-Antwort auf eine suboptimale PHA-Dosis bei optimaler Inkubationszeit, wogegen die übrigen Patienten (Sch., Wie.) vor allem gegen Con A nach 84-stündiger Inkubationszeit sowie gegen suboptimale Konzentrationen von PWM eine Erniedrigung der Reaktivität zeigten. Die übrigen Patienten (B. und F. als zwei willkürliche Beispiele hierfür) wiesen eine unauffällige Reaktivität auf (Tabelle 3).

Tabelle 3: Reaktivität frisch gewonnener PBL von 4 CAH-Patienten (R.,H.,Sch.,Wie.) mit unterschiedlich eingeschränkter Reaktivität sowie von 2 CAH-Patienten mit nicht supprimierter Reaktivität. Diese stehen als Beispiel für alle übrigen CAH-Patienten (B., F.).
IZ: Inkubationszeit in Stunden (h)
SO: suboptimale Mitogendosis
O : optimale Mitogendosis

Tab. 3:

% der cpm der Kontrollen

Name	IZ (h)	MLC	PHA		Con A		PWM (µg/ml)			PPD	
			SO	O	SO	O	0,4	15	85	SO	O
R.	84		44	78	84	29					
	108		36	136	53	105					
	132	76	31	85	69	44	77	30	49	-	-
H.	84		130	210	121	107					
	108		42	265	170	172					
	132	114	-	-	-	-	239	221	141	39	118
Sch.	84		76	68	21	32					
	108		-	-	-	-					
	132	-	115	223	140	178	22	107	-	-	-
Wie.	84		81	90	59	45					
	108		57	72	106	50					
	132	83	68	113	66	71	46	70	65	69	332
B.	84		123	230	167	120					
	108		111	230	170	184					
	132	110	134	209	165	191	489	211	141	300	172
F.	84		127	222	154	175					
	108		123	216	128	198					
	132	183	137	238	158	179	407	168	87	48	93

Tab. 4:

% der cpm der Kontrollen

Name	IZ (h)	MLC	PHA SO	PHA O	Con A SO	Con A O	PWM (µg/ml) 0,4	PWM (µg/ml) 15	PWM (µg/ml) 85	PPD SO	PPD O
Wie.	84		10	47	-	-					
	108		150	101	10	17					
	132	114	-	-	14	17	-	14	27	20	25
Sch.	84		26	63	104	178					
	108		-	-	-	-					
	132	-	-	-	-	-	26	53	-	-	-
F.	84		103	103	68	100					
	108		114	133	136	128					
	132	179	-	-	-	-	-	121	126	-	-
B.	84		144	205	136	160					
	108		100	139	210	152					
	132	77	-	-	-	-	-	139	115	-	-
R.	84		279	233	350	148					
	108		56	107	72	105					
	132	-	140	63	140	94	400	169	106	-	-
H.	84		101	101	65	158					
	108		100	64	100	73					
	132	67	-	-	-	-	-	100	87	-	-

Tabelle 4: Reaktivität der PBL von 2 CAH-Patienten mit supprimierter Immunantwort (Wie., Sch.) nach Präinkubation sowie von 4 CAH-Patienten mit unauffälligem Verhalten (F., B., R., H.) nach der Präinkubation. IZ = Inkubationszeit, SO = suboptimale, O = optimale Mitogendosis.

3.3. Reaktivität der PBL nach der Präinkubation (C in Abbildung 1)

Beim Ansatz nach der Präinkubation wurde bei zwei Patienten eine supprimierte Immunantwort beobachtet. Bei einem dieser Patienten lag eine generelle Einschränkung der PHA-, Con A-, PWM- und PPD-Stimulierbarkeit vor (Wie.), beim anderen (Sch.) war vor allem die PHA- und PWM-Reaktivität betroffen. Dies zeigt Tabelle 4, in der auch die Ergebnisse einzelner unauffälliger Befunde wiedergegeben sind. (F., B., R., H.).

3.4. Verhalten der Lymphozytenreaktivität in der zellvermittelten Immunantwort (CMI) hinsichtlich der Veränderungen vor und nach Präinkubation (B versus C in Abbildung 1)

Unter den stark variierenden Immunantworten konnten im Wesentlichen drei verschiedene Verhaltensmuster hinsichtlich der Veränderungen der Lymphozytenreaktivität vor und nach Präinkubation gefunden werden.

Erstes Verhaltensmuster:
Eine unauffällige Reaktivität sowohl vor als auch nach Präinkubation wurde bei dem größten Teil der CAH-Patienten gefunden. In Abbildung 2 und Tabelle 5 ist ein Beispiel für dieses Verhaltensmuster gezeigt.

Zweites Verhaltensmuster:
Bei zwei der vier CAH-Patienten mit verminderter Reaktivität in den verschiedenen CMI-Parametern

Abbildung 2:

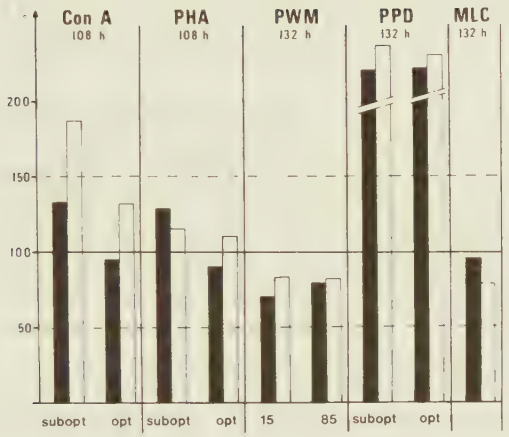

Abbildung 2: Reaktivität der PBL des Patienten W. vor und nach Präinkubation.
Schwarze Säule: vor Präinkubation
Weiße Säule: nach Präinkubation
subopt.: suboptimale Mitogendosis
opt.: optimale Mitogendosis
Die angegebenen Stundenwerte (h) geben die Inkubationszeit (IZ) wieder.

Tabelle 5: (zu Abbildung 2)

% der cpm der Kontrollen

W.	IZ (h)	MLC	PHA SO	PHA O	Con A SO	Con A O	PWM (µg/ml) 0,4	PWM (µg/ml) 15	PWM (µg/ml) 85	PPD SO	PPD O
vor PI	84		100	83	78	73					
	108		129	95	133	95					
	132	96	98	126	143	150	84	70	79	300	301
	84		258	89	-	-					
	108		116	110	187	132					
	132	79	-	-	167	85	-	82	83	1027	514

Tabelle 5: Antwort der PBL des Patienten W. in Prozent der "counts per minute" (cpm) der Kontrollen vor und nach Präinkubation (PI)
SO: suboptimale Mitogendosis
O : optimale Mitogendosis

vor der Präinkubation zeigte sich bei Testung nach sechstägiger Kultur eine normale oder gar etwas gesteigerte Immunreaktivität (Abbildung 3 mit Tabelle 6 sowie Abbildung 4 - siehe auch Tabelle 4: R. und H.).

Drittes Verhaltensmuster:
Die verminderte (Abbildung 5 und Tabelle 7) oder unauffällige (Abbildung 6 und Tabelle 8) Lymphozytenreaktivität, die in der ersten Kultur beobachtet worden war, blieb weiterhin bestehen (Sch.) oder verstärkte sich sogar nach der Präinkubation der PBL (Wie.).
Das normale Verhalten der Lymphozytenreaktivität vor und nach Präinkubation zeigt Abbildung 2 und Tabelle 5 gibt die entsprechenden Zahlenwerte wieder.

3.5. Einfluß der Überstände auf die Lymphozytenreaktionsfähigkeit von Lymphozyten Gesunder (D in Abbildung 1)

Der Überstand der CAH-PBL der beiden Patienten des zweiten Verhaltensmusters unterschied sich in seinem Einfluß auf frisch isolierte PBL von Gesunden nicht von dem Überstand, der von den jeweiligen Kontrollen gewonnen wurde (Abbildung 7 und Tabelle 9).

Auch unterschied sich der Einfluß des Überstandes der CAH-PBL mit dem dritten Verhaltensmuster nicht von dem der Kontrollen (Abbildungen 8, 9 und Tabellen 10, 11). Somit verhielten sich diese CAH-Überstände wie PBL-Überstände von

Abbildung 3:

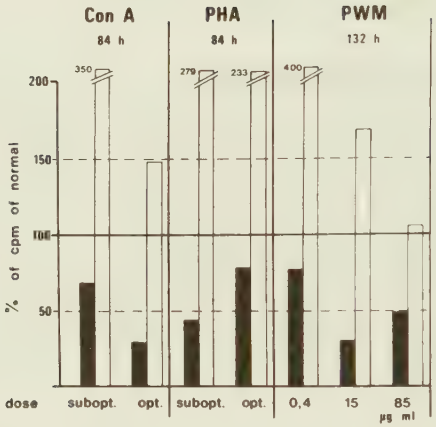

Abbildung 3: Reaktivität der PBL des Patienten R. vor und nach Präinkubation.
Schwarze Säule: vor Präinkubation
Weiße Säule: nach Präinkubation
subopt.: suboptimale Mitogendosis
opt.: optimale Mitogendosis
Die angegebenen Stundenwerte (h) geben die Inkubationszeit (IZ) wieder.

Tabelle 6: (zu Abbildung 3)

% der cpm der Kontrollen

R.	IZ (h)	MLC	PHA SO	PHA O	Con A SO	Con A O	PWM (µg/ml) 0,4	PWM (µg/ml) 15	PWM (µg/ml) 85
vor PI	84		44	78	84	29			
	108		36	136	53	105			
	132		31	85	69	44	77	30	49
nach PI	84		279	233	350	148			
	108		56	107	72	105			
	132		140	63	140	94	400	169	106

Tabelle 6: Antwort der PBL des Patienten R. in Prozent der "counts per minute" (cpm) der Kontrollen vor und nach Präinkubation (PI).

SO: suboptimale Mitogendosis
O: optimale Mitogendosis

Abbildung 4:

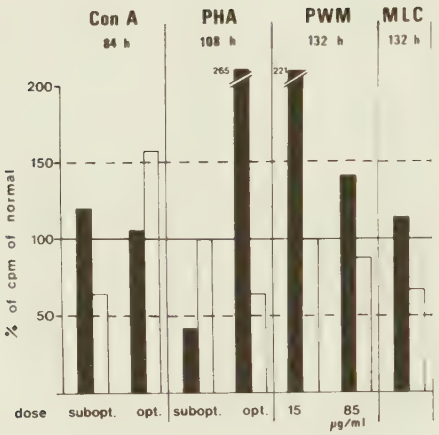

Abbildung 4: Reaktivität der PBL des Patienten H. vor und nach Präinkubation.
Schwarze Säule: vor Präinkubation
Weiße Säule: nach Präinkubation
subopt.: suboptimale Mitogendosis
opt.: optimale Mitogendosis
Die Stundenwerte (h) geben die Inkubationszeit (IZ) wieder.

Abbildung 5:

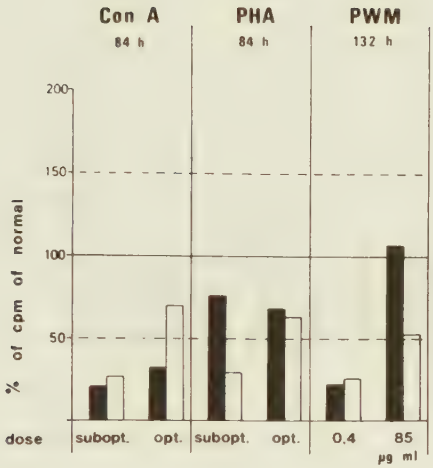

Abbildung 5: Reaktivität der PBL des Patienten Sch. vor und nach Präinkubation.
Schwarze Säule: vor Präinkubation
Weiße Säule: nach Präinkubation
subopt.: suboptimale Mitogendosis
opt.: optimale Mitogendosis
Die Stundenwerte (h) geben die Inkubationszeit (IZ) wieder.

Tabelle 7: (zu Abbildung 5)

% der cpm der Kontrollen

Sch.	IZ (h)	PHA SO	PHA O	Con A SO	Con A O	PWM (µg/ml) 0,4	PWM (µg/ml) 15	PWM (µg/ml) 85
vor PI	84	76	68	21	32			
	108	-	-	-	-			
	132	115	123	140	178	22	107	-
	84	29	63	27	69			
	108	-	-	-	-			
	132	-	-	-	-	26	52	-

Tabelle 7: Antwort der PBL des Patienten Sch. in Prozent der "counts per minute" (cpm) der Kontrollen vor und nach Präinkubation (PI).
SO: suboptimale Mitogendosis
O: optimale Mitogendosis

Abbildung 6:

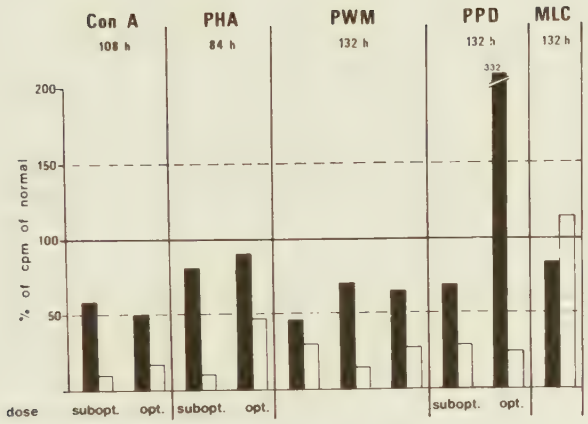

Abbildung 6: Reaktivität der PBL des Patienten Wie. vor und nach Präinkubation.
Schwarze Säule: vor Präinkubation
Weiße Säule: nach Präinkubation
subopt.: suboptimale Mitogendosis
opt.: optimale Mitogendosis
Die angegebenen Stundenwerte (h) geben die Inkubationszeit (IZ) wieder.

Tabelle 8: (zu Abbildung 6)

% der cpm der Kontrollen

Wie.	IZ (h)	MLC	PHA SO	PHA O	Con A SO	Con A O	PWM (µg/ml) 0,4	PWM (µg/ml) 15	PWM (µg/ml) 85	PPD SO	PPD O
vor PI	84		81	90	59	45					
	108		57	72	58	50					
	132	83	68	113	66	71	46	70	65	69	332
nach PI	84		10	47	-	-					
	108		150	101	10	17					
	132	114	-	-	14	17	13	14	27	29	25

Tabelle 8: Antwort der PBL des Patienten Wie. in Prozent der "counts per minute" (cpm) der Kontrollen vor und nach der Präinkubation (PI).
SO: suboptimale Mitogendosis
O: optimale Mitogendosis

Abbildung 7:

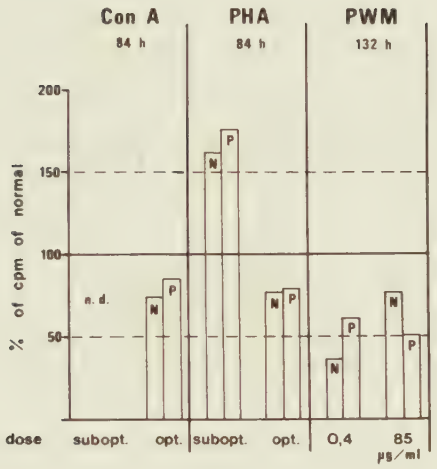

Abbildung 7: Reaktivität frisch isolierter PBL von Gesunden jeweils mit Überständen von PBL-Kulturen von Normalpersonen (N) und solchen vom Patienten R.
subopt.: suboptimale Mitogendosis
opt.: optimale Mitogendosis
n.d.: Stimulation der PBL mit dieser Mitogendosis wurde nicht durchgeführt.
Die Stundenwerte (h) geben die Inkubationszeit (IZ) wieder.

Tabelle 9: (zu Abbildung 7)

% der cpm der Kontrollen

	IZ (h)	MLC	PHA SO	PHA O	Con A SO	Con A O	PWM (µg/ml) 0,4	PWM (µg/ml) 15	PWM (µg/ml) 85
Überstand R.(P)	84		177	79	-	85			
	108		104	92	106	102			
	132	-	-	-	-	-	61	51	-
Überstand (N)	84		162	77	-	74			
	108		103	82	75	114			
	132	-	-	-	-	-	36	77	-

Tabelle 9: Antwort frisch isolierter PBL Gesunder in Prozent der "counts per minute" (cpm) der Kontrollen mit Überständen von PBL-Kulturen des Patienten R. (P) und solchen von einer Normalperson (N).
SO: suboptimale Mitogendosis
O: optimale Mitogendosis

Abbildung 8:

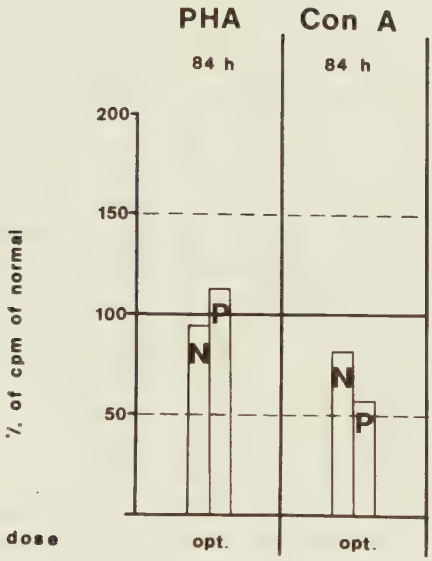

Abbildung 8: Reaktivität frisch isolierter PBL von Gesunden jeweils mit Überständen von PBL-Kulturen von Normalpersonen (N) und solchen von Patient Sch. (P.).
opt.: optimale Mitogendosis
Die angegebenen Stundenwerte (h) geben die Inkubationszeit (IZ) wieder.

Tabelle 10: (zu Abbildung 8)

	% der cpm der Kontrollen				
	IZ (h)	PHA SO	O	Con A SO	O
Überstand Sch. (P)	84	217	113	54	58
Überstand (N)	84	82	94	77	83

Tabelle 10: Antwort frisch isolierter PBL Gesunder in Prozent der "counts per minute" (cpm) der Kontrollen mit Überständen von PBL-Kulturen des Patienten Sch. und solchen einer Normalperson (N).
SO: suboptimale Mitogendosis
O: optimale Mitogendosis

Abbildung 9:

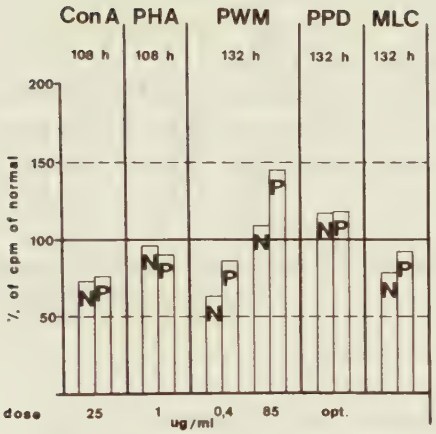

Abbildung 9: Reaktivität frisch isolierter PBL von Gesunden jeweils mit Überständen von PBL-Kulturen von Normalperson (N) und solchen von Patient Wie. (P). opt.: optimale Mitogendosis Die Stundenwerte (h) geben die Inkubationszeit (IZ) wieder.

Tabelle 11: (zu Abbildung 9)

			% der cpm der Kontrollen				
	IZ (h)	MLC	PHA 1/ug/ml	Con A 25/ug/ml	PWM (/ug/ml) 0,4	85	PPD 0
Überstand Wie. (P)	84		134	-			
	108		90	76			
	132	92	-	67	86	145	118
Überstand (N)	84		88	-			
	108		96	73			
	132	78	-	72	63	109	117

Tabelle 11: Antwort frisch isolierter PBL Gesunder in Prozent der "counts per minute" (cpm) der Kontrollen mit Überständen von PBL-Kulturen des Patienten Wie. (P) und solchen einer Normalperson (N).
O: optimale Mitogendosis

CAH-PBL mit normaler Reaktivität in der ersten und zweiten Kultur.

Nur ein CAH-Überstand übte eine suppressive Wirkung auf die Fähigkeit normaler PBL, auf mitogene Stimuli zu antworten aus. Dieser Effekt war besonders ausgeprägt bei suboptimalen Dosen von PHA und Con A, bei hohen Dosen von PWM und in der MLC (Abbildung 10 und Tabelle 12). Dieser Überstand war aber von CAH-PBL gewonnen worden, die im ersten und zweiten Ansatz der CMI eine normale Antwort zeigten.

3.6. Relation der Lymphozytenüberstände zur Lymphozytenreaktivität

3.6.1. Der einzige suppressiv wirkende Überstand stammte von einem CAH-Patienten, der bei der ersten und zweiten Testung (vor und nach Präinkubation) eine völlig normale Reaktivität in der zellvermittelten Immunreaktion zeigte.

3.6.2. Die beiden Patienten mit erniedrigter Reaktivität vor der Präinkubation und Normalisierung nach der Präinkubation hatten jedoch Überstände, die keinen Einfluß auf die Lymphozytenreaktivität von PBL Gesunder deutlich machten.

3.6.3. Auch die Überstände der Patienten mit herabgesetzter Aktivität vor und nach Präinkubation blieben ohne Einfluß auf die Lymphozytenreaktivität von PBL Gesunder.

Abbildung 10:

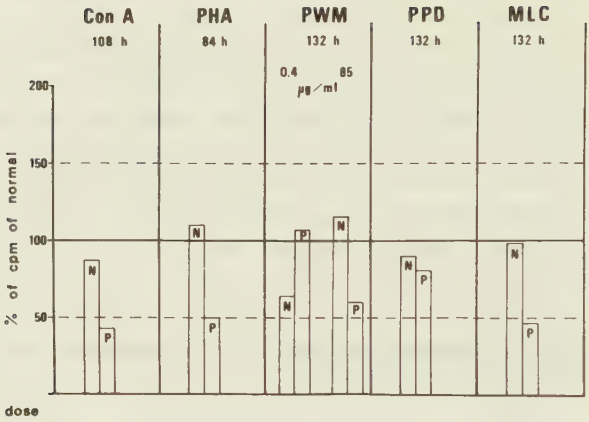

Abbildung 10: Reaktivität frisch isolierter PBL von Gesunden jeweils mit Überständen von PBL-Kulturen einer Normalperson (N) und solchen von Patient We. (P). opt.: optimale Mitogendosis
Die Stundenwerte (h) geben die Inkubationszeit (IZ) wieder.

Tabelle 12: (zu Abbildung 10)

			% der cpm der Kontrollen				
	IZ (h)	MLC	PHA 1 µg/ml	Con A 25 µg/ml	PWM (µg/ml) 0,4	85	PPD 0
Überstand We. (P)	84		50	43			
	108		62	70			
	132	47	-	-	107	60	81
Überstand (N)	84		110	78			
	108		92	63			
	132	91	-	-	64	116	90

Tabelle 12: Antwort frisch isolierter PBL Gesunder in Prozent der "counts per minute" (cpm) der Kontrollen mit Überständen von PBL-Kulturen des Patienten We. (P) und solchen einer Normalperson (N).
O: optimale Mitogendosis

3.7. Relation der Lymphozytenreaktivität zur

a) Hb_S-Antigenkonzentration im Serum

Die beiden Patienten (B., W.), die als einzige Hb_S-Ag positiv waren, zeigten in der CMI unauffällige Befunde.

b) HAFP-Konzentration im Serum

Bei keinem der Patienten, bei denen der Serum-HAFP-Spiegel bestimmt wurde, konnten erhöhte Alpha-1-Fetoproteinkonzentrationen im Serum nachgewiesen werden.

C DISKUSSION

In der vorliegenden Untersuchung gelang es nicht, in vivo gebundenes HAFP an der Oberfläche kleiner PBL von Patienten mit CAH nachzuweisen, wenn kontrollierte Immunfluoreszenzbedingungen zur Anwendung kamen.

Jüngste Untersuchungen machten deutlich, daß heterologe Immunglobuline sich an Fc-Rezeptoren von Makrophagen und bestimmten kleinen PBL über ihren Fc-Teil anlagern können. Dadurch kann es zu einer erhöhten Zahl falsch positiver Zellen für das zur immunfluoreszenzoptischen Untersuchung anstehende Antigen (Winchester et al., 1975; Sedlacek et al., 1976; Alexander et al., 1976) kommen. Diese unspezifische Fc-Rezeptorbindung von heterologem IgG tritt besonders extensiv bei der Anwendung der indirekten Immunfloureszenz auf (Sedlacek et al., 1976) sowie bei Verwendung von Kaninchenantikörpern (Alexander et al., 1977). Aber selbst bei Verwendung der eine niedrigere Avidität zur Bindung an den Fc-Rezeptor zeigenden Ziegenantikörper, wie sie in dieser Studie Verwendung fanden, kann es immer noch zu einer geringgradigen unspezifischen Anlagerung der kompletten heterologen Immunglobuline an die Lymphozyten kommen (Auer et al., 1978 b; Alexander und Sanders, 1977), wenngleich in deutlich geringerem Ausmaß. So ist es zum gegebenen Zeitpunkt unklar, ob es sich bei den insignifikanten Zahlen von kleinen PBL um Lymphozyten handelt, die in der Tat positiv für HAFP sind, oder ob es sich hier lediglich um den Ausdruck dieser

geringgradigen unspezifischen Bindung handelt. Wenn diese bisher unbeantwortete Frage zwar auch von allgemeinem Interesse ist, so hat dieser Befund einer geringen Zahl HAFP-positiver Lymphozyten doch kaum Bedeutung im Rahmen des hier angesprochenen Problemkreises. Denn diese HAFP-positiven Lymphozyten unterscheiden sich in der Zahl nicht zwischen Gesunden und Patienten mit CAH.

Hingegen war der Anteil HAFP-positiver Makrophagen bei CAH-Patienten deutlich höher als bei Gesunden. Dieser Befund ist jedoch wahrscheinlich als Folge einer erhöhten Makrophagenaktivität und damit Fc-Rezeptoraktivität zu bewerten. Inwieweit diese erst neuerdings klar gewordenen technischen Fußangeln für die Diskrepanz zwischen den Befunden von Keller und Mitarbeitern und unseren Ergebnissen verantwortlich sind, ist im Moment nicht sicher, jedoch spricht eine hohe Wahrscheinlichkeit dafür.

Daß unsere negativen Ergebnisse nicht einfach Folge eines technischen Fehlers im Nachweis von HAFP an isolierten Lymphozyten sind, obwohl es an PBL vorliegt, kann auf Grund folgender Befunde ausgeschlossen werden:

1.) Es wurde von Keller und Tomasi vorgeschlagen, daß ein anderer, indirekter Weg des Nachweises von in vivo gebundenem HAFP das Erscheinen einer immunsuppressiven Aktivität in den Überständen von solchen CAH-PBL sei, die eine erniedrigte in vitro PHA-Stimulierbarkeit besäßen (Tomasi et al., 1975; Keller et al., 1976), wogegen die zunächst immunsupprimierten PBL dann eine normale Reaktivität nach Präinkubation erlangen.

Bei zwei der CAH-Patienten, die den extensiven in vitro Funktionstests unterzogen wurden, konnten wir bestätigen, daß es zu einer Normalisierung und sogar übernormalen Reaktivität der ursprünglich supprimierten PHA-Stimulierbarkeit der CAH-PBL nach Kurzzeitkultur kam. Da aber die Überstände dieser Kulturen keine immunsuppressive Aktivität erlangten, kann ausgeschlossen werden, daß diese ursprüngliche Immunsuppression der PBL Folge von in der Immunfluoreszenz nicht nachgewiesenem, wenn auch vorhandenem in vivo an PBL gebundenem HAFP ist.

2.) Zum anderen zeigte ein Überstand der CAH-PBL-Kurzzeitkulturen eine ausgeprägte suppressive Aktivität, ähnlich der von Keller und Mitarbeitern berichteten Aktivität. In diesem Fall aber bestand kein Bezug zwischen diesem Einfluß der CAH-Überstände auf die Immunreaktivität normaler PBL einschließlich der PHA-Stimulierbarkeit und der Immunreaktivität der entsprechenden CAH-PBL in der ersten und zweiten Kultur, d. h. vor bzw. nach Präinkubation der Lymphozyten; denn diese Lymphozyten zeigten eine unauffällige Immunreaktivität in allen getesteten Immunparametern der CMI anläßlich der ersten und zweiten Funktionstestung.

Das Unvermögen, eine Hypothese zu beweisen oder positive Daten zu bestätigen ohne gleichzeitig eine Erklärung für die Diskrepanz der Befunde vorlegen zu können, bedeutet nicht, daß die Hypothese bzw. die Daten widerlegt wurden. Die aufgezeigte Problematik der Immunfluoreszenztechnik an isolierten Lymphozyten bietet jedoch

eine derartige Erklärung zum Widerspruch der Befunde zwischen diesen und den von Keller et al., 1976, erhobenen Befunden an.

Vorausgesetzt, daß wir in vivo gebundenes HAFP nicht während der Isolierung der PBL verloren haben, wobei unsere Isolierungsmethode weitgehend der von Keller et al. entspricht, kann aus unserer Untersuchung jedenfalls geschlossen werden, daß die allgemeine pathogenetische Rolle, die dem HAFP für die Entwicklung der CAH zugeschrieben wurde, nicht von grundsätzlicher und allgemeiner pathophysiologischer Bedeutung sein kann.

LITERATURVERZEICHNIS

Alexander, B. L., Sander, S. S. K.: $F(ab)_2$reagents are not required if goat, rather than rabbit antibodies are used to detect human surface immunglobulin. Immunol. 119:1084-88, 1977

Alpert, E., Perencevich, R. C.: Human Alpha-fetoprotein immunochemical analysis of isoproteins. Ann. NY Acad. Sci. 259:131-35, 1975

Alpert, E., Dienstag, J. L., Spersky, S., Littman, B., Rocklin, R.: Immunosuppressive characteristics of human AFP: Effect on tests of cell mediated immunity and induction of human suppressor cells. Immunol. Comm. 7(2):163-185, 1978

Auer, I. O., Kress, H. G., Buschmann, Ch.: Studies on an immunregulatory function of human alpha-fetoprotein, in: Protides of Biological Fluids, Vol. 24, Peeters, H. ed. Pergamon Press, Oxford, pp. 289-93, 1976

Auer, I. O.:Suppression of in vitro parameters of the cell mediated immunity by human alpha-1-fetoprotein. Scand. J. Immunol. (Suppl.), 1977

Auer, I. O., Kress, H. G.: Suppression of the primary cell mediated immune response by human alpha-1-fetoprotein in vitro. Cell. Immunol. 30: 173-79, 1977

Auer, I. O., Wechsler, W., Ziemer, E., Malchow, H., Sommer, H.: Immune status in Crohn's disease. I. Leukocyte and lymphocyte subpopulations in peripheral blood. Scand. J. Gastroent. 13:561-71, 1978 b

Auer, I. O.: Suppression of in vitro T-cell-responds to allogeneic cells and to mitogens by human alpha-fetoprotein. In: AFP in clinical medicine (Herausgeber: Weitzel, H. K., Schneider, J.): pp 97-104, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1979

Ayoub, J., Kasakura, S.: In vitro response of foetal lymphocytes to PHA, and a plasma factor which suppresses the PHA response of adult lymphocytes. Clin. Exp. Immunol. 8:427, 1971

Belanger, L., Hamel, D., Lachance, L., Dufour, D., Tremblay, M., Gagnon, P. M.: Hormonal regulation of alpha-fetoprotein. Nature 256:657-59, 1975

Boyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation by 1 g. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (suppl. 97):77, 1968

Eleftheriou, N., Haethcote, J., Thomas, H. C., Sherlock, S.: Serum alpha-fetoprotein levels in patients with acute and chronic liver disease. J. Clin. Pathol. 30:704, 1977

Gitlin, D., Boesman, M.: Serum alpha-fetoprotein, albumin and Gamma-globulin in the human conceptus. J. Clinic. Invest. 45:1826-38, 1966

Gitlin, D., Kitzes, J., Boesman, M.: Cellular distribution of serum alpha-fetoprotein in organs of the foetal rat. Nature 215:534, 1967

Gitlin, D.: Normal biology of Alpha-fetoprotein. Ann. NY Acad. Sci. 259:7-16,1975

Hassoux, R., Berges, J., Uriel, J.: Affinity chromatography of mouse alpha-fetoprotein (AFP) on oestradiol-sepharose adsorbents-isolation and properties. J. Steroid Biochem. 8:127, 1977

Kaplan, M. S., Byers, V. S., Levin, A. S., German, D. F., Fudenberg, H. E., Lecam, L. N.: Circadian rhythm of stimulated lymphocyte blastogenesis. Journal of Allergy and Clinical Immunology 58:180-89, 1976

Kasakura, S.: A factor in maternal plasma during pregnancy that suppresses the reactivity of mixed leucocyte cultures. J. Immunol. 107:1296, 1971

Keller, R. H., Summerskill, W. H. J., Guebel, A. P.: Alpha-fetoprotein and suppression of cell mediated immunity in chronic active liver disease (CALD). Gastroenterology 70:901, 1976

Leffert, H. L., Sell, S.: Alpha-1-fetoprotein biosynthesis during the growth cycle of differentiated fetal rat hepatocytes in primary monolayer culture. J. Cell. Biol. 61:823-29, 1974

Masseyeff, R., Gilli, J., Krebs, B., Calluaud, A., Bonet, C.: Evolution of alpha-fetoprotein serum levels throughout life in humans and rats, and during pregnancy in the rat. Ann. NY Acad. Sci. 259:17-28, 1975

Murgita, R. A., Tomasi, T. B.: Suppression of the immune response by alpha-fetoprotein. I. The effect of mouse alpha-fetoprotein on the primary and secondary antibody response. J. Exp. Med. 141:269, 1975 a

Murgita, R. A., Tomasi, T. B.: Suppression of the immune response by alpha-fetoprotein. II. The effect of mouse alpha-fetoprotein on mixed lymphocyte reactivity and mitogen induced lymphocyte transformation. J. Exp. Med. 141:440, 1975 b

Ruoslahti, E., Pihko, H., Seppala, M.: Alpha-fetoprotein: Immuno-chemical purification and chemical properties. Expression in normal state and in malignant and nonmalignant liver diseases. Transplant. Rev. 20:38-60, 1974

Ruoslahti, E., Pihko, J.: Effect of chemical modification on the immunogenicity of homologous alpha-fetoprotein. Ann NY Acad. Sci. 259:85-94, 1975

Savu, L., Valette, G., Nunez, B., Azzia, M., Jayle, M. F.: pp 75-83, In L'alpha-fetoproteine, ed. by R. Masseyeff, INSERM, Paris, 1974

Sedlacek, H. H., Dersjant, H., Baudner, S., Seiler, F. R.: Critical evaluation of the value of immunofluorescence methods for the demonstration of immunoglobulins on the lymphocyte surface. Behring Inst. Mitt. 59:38-63, 1976

Smith, J. K., Caspary, E. A., Field, E. J.: Immune response in pregnancy. Lancet I:96, 1972

Swarz, S. K., Soloff, M. S.: A comparision of the estrogen binding activity of rat and human alpha-fetoprotein. pp 97-108, In L'alpha-fetoproteine, ed. by R. Masseyeff, INSERM, Paris, 1974

Tavadia, H. B., Fleming, K. A., Hume, P. D., Simpson, H. W.: Circadian rhythmicity of human plasma cortisol and PHA-induced lymphocyte transformation. Clin. Exp. Immunol. 22:190, 1975

Thong, Y. H., Russel, B., Steele, W., Vincent, M. M., Henson, S. A., Bellanti, J. A.: Impaired in vitro cell mediated immunity to rubella virus during pregnancy. N. Engl. J. Med. 289,604, 1973

Thurman, G. B., Strong, D. M., Ahmed, A., Green, S. S., Sell, K. W., Hartzman, R. J., Bach, F. H.: Human mixed lymphocyte cultures. Evaluation of a microculture technique utilizing the multiple automated sample harvester (MASH). Clinical and Experimental Immunology 15:289-302, 1973

Tomasi, T. B., Dattwyler, R. J., Murgita, R. A., Keller, R. H.: Immunosuppression by alpha-feto-protein. Trans. act. Ass. Amer. Physic. 88:293-299, 1975

Uriel, J., de Neuchaud, B., Dupiers, M.: Estrogen-binding properties of rat, mouse and man feto specific serum proteins. Demonstration by immunoautoradiographic methods. Biochim. biophys. Res. Commun. 46:1175, 1972

Uriel, J.: Carcinofoetal antigens. pp. 381-384. In Progress in Immunology II, part 3, ed. by J. Holborow, North Holland, American Elsevier, 1974

Uriel, J., Aussel, C., Bouillon, D., Loisillier, F., de Neuchaud, B.: Liver differentiation and the estrogen binding properties of alpha-fetoprotein. Ann. NY Acad. Sci. 259:119, 1975

Weiss, W.: Klinische Relevanz der Alpha-1-Fetoprotein (AFP)-Bestimmung im Serum. Onkologie 1:6-14, 1978

Winchester, R. J., Fu, S. M., Hoffman, T., Kunkel, H. G.: IgG on lymphocyte surfaces, technical problems and the significance of a third cell population. J. Immunol. 114:1210-12, 1975

Yachnin, S.: Demonstration of the inhibitory effect of human alpha-fetoprotein on in vitro transformation of human lymphocytes. Nat. Acad. Sci. USA 73:2857-61, 1976

Yachnin, S., Lester, E.: Inhibition of human lymphocyte transformation by human alpha-fetoprotein (HAFP); comparison of foetal and hepatoma HAFP and kinetic studies of in vitro immunosuppression. Clin. Immunol. 26:484-90, 1976

Herrn Prof. Dr. H. A. Kühn danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Priv. Doz. Dr. I. O. Auer gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und die hilfreiche Unterstützung.

L e b e n s l a u f

Ich wurde am 23. Oktober 1953 als viertes Kind des Lackierermeisters Karl Fritz Götz und seiner Ehefrau Marie Ludmila, geborene Jezdinský in Arzberg / Oberfranken geboren.
Nach vierjährigem Besuch der Hauptschule in Arzberg trat ich 1964 in das Otto-Hahn-Gymnasium in Marktredwitz ein und legte dort 1973 die Abitursprüfung ab.
Zum Wintersemester des gleichen Jahres nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf.
1975 legte ich mit Erfolg die Ärztliche Vorprüfung, 1976 den ersten Abschnitt, 1978 den zweiten Abschnitt und im Herbst 1979 den dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab.

Würzburg, im Januar 1980

Karl Götz

(Karl Götz)